

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-78978

(P2000-78978A)

(43) 公開日 平成12年3月21日 (2000.3.21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/40		C 0 7 K 14/40	4 B 0 5 0
19/00		19/00	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
9/14		9/14	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-251526

(22) 出願日 平成10年9月4日 (1998.9.4)

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 米田 俊浩

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72) 発明者 近藤 恵二

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社基盤技術研究所内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

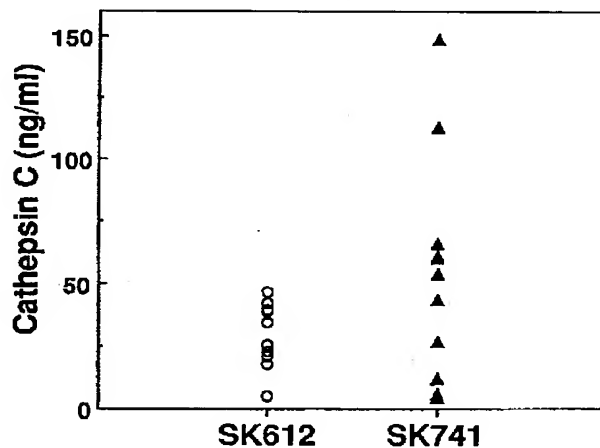
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株及び異種タンパク質製造用宿主としてのその使用

(57) 【要約】

【課題】 異種遺伝子の高発現を可能にするカンジダ・ボイジニ (*Candida boidinii*) 株、それを利用する異種タンパク質の製造方法を提供すること。

【解決手段】 プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株、特にプロテイナーゼA、プロテイナーゼB又はその両方のプロテアーゼ活性が喪失されたカンジダ・ボイジニ株、このカンジダ・ボイジニ株を、有用な異種タンパク質 (例えばカテプシンC) をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換して異種タンパク質を製造する方法、プロテイナーゼA活性又はプロテイナーゼB活性を有するタンパク質、それらのタンパク質をコードするDNA、並びにカンジダ・ボイジニ由来プロテイナーゼAの分泌シグナルペプチド。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ (*Candida boidinii*) 株。

【請求項 2】 プロテイナーゼ A、プロテイナーゼ B 又はその両方のプロテアーゼ活性が喪失された、請求項 1 に記載のカンジダ・ボイジニ株。

【請求項 3】 カンジダ・ボイジニ SK 740 株、SK 741 株、SK 774 株又は SK 775 株である、請求項 2 に記載のカンジダ・ボイジニ株。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれかに記載のカンジダ・ボイジニ株を、有用な異種タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成した異種タンパク質を回収することを含む、タンパク質の製造方法。

【請求項 5】 異種タンパク質がカテプシン C である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 発現ベクターが、異種タンパク質をコードする遺伝子の 5' 末端に隣接して分泌シグナルペプチド配列をコードする DNA を含む、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】 分泌シグナルペプチド配列がプロテアーゼタンパク質由来のものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 分泌シグナルペプチド配列が配列番号 4 に示すアミノ酸配列からなる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 配列番号 2 に示される 23 位～420 位のアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも 80% の相同性を有するように 1 個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼ A 又はその誘導体。

【請求項 10】 請求項 9 に記載のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼ A 又はその誘導体をコードする DNA。

【請求項 11】 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも 80% の相同性を有するように 1 個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する、カンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼ A 又はその誘導体。

【請求項 12】 請求項 11 に記載のカンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼ A 又はその誘導体をコードする DNA。

【請求項 13】 配列番号 3 に示される塩基配列を有する、請求項 12 に記載の DNA。

【請求項 14】 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも 80% の相同性を有するように 1 個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテ

ナーゼ B 又はその誘導体。

【請求項 15】 請求項 14 に記載のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼ B 又はその誘導体をコードする DNA。

【請求項 16】 配列番号 6 に示される塩基配列を有する、請求項 15 に記載の DNA。

【請求項 17】 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる、カンジダ・ボイジニ由来プロテイナーゼ A の分泌シグナルペプチド。

【請求項 18】 カンジダ・ボイジニ SK 741 株。

【請求項 19】 カンジダ・ボイジニ SK 741 株を、カテプシン C をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成したカテプシン C を回収することを含む、カテプシン C の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、カンジダ・ボイジニ (*Candida boidinii*) のプロテアーゼ遺伝子、該プロテアーゼ遺伝子を改変した DNA を有するカンジダ・ボイジニ株、該カンジダ・ボイジニ株を宿主として用いる異種タンパク質の製造法に関する。このカンジダ・ボイジニ株を宿主とするタンパク質発現系を用いれば、目的異種タンパク質を収率よく生産することができる。また、本発明は、カンジダ・ボイジニを宿主とする異種タンパク質の分泌発現に有用なシグナルペプチドに関し、該シグナルペプチドを利用する異種タンパク質の分泌発現系、及び該分泌発現系を用いる異種タンパク質の製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 メタノール資化性酵母カンジダ・ボイジニは、近年、異種タンパク質発現系の有効な宿主として開発されてきた。メタノール資化経路に存在するアルコールオキシダーゼ、ジヒドロキシアセトンシンターゼ、ギ酸脱水素酵素はメタノール存在下で培養すると、著量生産され、それらの遺伝子の調節領域を用いた異種遺伝子の発現方法が研究されている（特開平 5-344895 号公報、国際公開第 WO 97/10345 号等）。しかしながら異種タンパク質を遺伝子組み換え法によって生産する場合、目的産物が宿主由来のプロテアーゼによって分解されることがある。そのような場合、目的タンパク質の生産量が減少し、またタンパク質分解産物の混入により目的タンパク質の精製が困難となる。

【0003】 遺伝子組み換え法によって生産される目的タンパク質の分解の問題を回避するために、目的タンパク質を分解するプロテアーゼ活性を阻害するような培養方法が用いられてきた。例えば組換え体を培養する培地の pH を調整することによりプロテアーゼ作用を阻害することが可能である。しかしながらこの方法はある種の異種タンパク質を発現する宿主酵母の増殖に影響を与えるであろうし、細胞外でのタンパク質の分解にのみ効果

的である。

【0004】一方、酵母*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*においてプロテイナーゼA、プロテイナーゼBを不活性化した株をプロテアーゼ欠損株として用いることにより、菌体内及び菌体外タンパク質生産を増加させたという例が示されている（特表平6-506117号公報、Weis, H. M. ら, *FEBS Lett.*, 37, 451 (1995)、Inoue, K. ら, *Plant Cell Physiol.*, 38 (3), 366 (1997)）。

【0005】プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは液胞に局在するプロテアーゼで、それぞれPEP4遺伝子、PRB1遺伝子によってコードされている。酵母*Saccharomyces cerevisiae*の研究によれば、プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは自分自身やカルボキシペプチダーゼYなどの別のプロテアーゼを活性化する（vandenHazel, H. B. ら, *YEAST*, 12, 1 (1996)）。ところで、カンジダ・ボイジニを用いて異種遺伝子を発現させる際、タンパク質生産量を高めるためにプロテアーゼ欠損株を用いることについては全く知られていなかったが、また当業者においてそのような想起を拒む以下に示すような問題点があった。

【0006】*Saccharomyces cerevisiae*や*Pichia pastoris*とカンジダ・ボイジニとは菌学的に本質的に異なっていて、多くの代謝的、生理的相違が存在する。それゆえタンパク質分解機構が異なっていることは容易に推測される。今のところカンジダ・ボイジニに存在するタンパク質分解活性についての知見は全く存在せず、本発明者らによって今回初めて、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*ではプロテイナーゼA遺伝子欠損によって完全に活性を失うカルボキシペプチダーゼYが、プロテイナーゼA遺伝子を欠損したカンジダ・ボイジニにおいては約40%活性が残存していることが見いだされたが、この例もカンジダ・ボイジニのタンパク質分解機構が前記の他の2つの酵母のものとは異なることを示すものである。

【0007】プロテアーゼ欠損株の取得は、変異株のスクリーニング、遺伝子破壊によって取得される。変異株をスクリーニングするためには膨大な数の変異株について解析しなければならず、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*と異なり、胞子形成能のないカンジダ・ボイジニではかけ合せにより目的とする遺伝子だけに変異が導入されたかどうか解析することは不可能である。さらに変異した形質が変異前の状態に戻る復帰変異株も起こり得る。一方、遺伝子破壊法は目的とする遺伝子だけを欠損させることが可能であるため、有効な手法であるが、遺

伝子破壊を行うために宿主の目的遺伝子領域を獲得しなければならない。しかしながら、カンジダ・ボイジニに関するこのようなプロテアーゼ及びその遺伝子に関する知見は現在まで全く得られていない。したがって、カンジダ・ボイジニのプロテアーゼ欠損株を利用した発現系における生産性の向上について、これまで何ら検討されてこなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、カンジダ・ボイジニに由来するプロテアーゼ、そのプロテアーゼをコードする塩基配列を有するDNA、及びそのプロテアーゼ遺伝子の欠失したカンジダ・ボイジニ株を提供することを目的とする。またそのプロテアーゼタンパク質に由来する分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列を酵母分泌発現系に有用なシグナルペプチド、及びそのシグナルペプチドを利用した異種タンパク質の分泌生産方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、メタノール資化性酵母*Canidida boidinii*のプロテアーゼ遺伝子を解析し、異種遺伝子の効率的発現を達成すべく鋭意研究を行った結果、プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株を用いて異種遺伝子の高発現を達成することにより、本発明を完成するに至った。本発明は、プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株を提供する。ここで、プロテアーゼは組換え技術での発現によって生成された異種タンパク質の分解に関与するものであるのが好ましい。その種のプロテアーゼの少なくとも1つの活性を喪失させることによって、全体的にプロテアーゼ活性を低下させることができる。

【0010】本発明の実施態様において、本発明はプロテイナーゼA、プロテイナーゼB又はその両方のプロテアーゼ活性が喪失されたカンジダ・ボイジニ株を提供する。より具体的には、そのような菌株はカンジダ・ボイジニSK740株、SK741株、SK774株又はSK775株である。本発明はまた、上記の本カンジダ・ボイジニ株を、有用な異種タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成した異種タンパク質を回収することを含む、タンパク質の製造方法を提供する。

【0011】本発明の実施態様において、本発明には、カンジダ・ボイジニSK741株を、カテプシンCをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換し、適当な培地にて培養し、生成したカテプシンCを回収することを含む、カテプシンCの製造方法が包含される。発現ベクターは、異種タンパク質をコードする遺伝子の5'末端に隣接して分泌シグナルペプチド配列をコードするDNAを含むことができる。シグナルペプチドはゴルジ体で合成された前駆体タンパク質を膜に輸送する役割を有し、シグナルペプチダーゼにより切断され、結果的に

成熟タンパク質が細胞外に分泌されることになる。本発明の実施態様において、分泌シグナルペプチド配列はプロテアーゼタンパク質由来のもの、より具体的にはカンジダ・ボイジニのプロテイナーゼA由来の配列番号4に示すアミノ酸配列からなる。

【0012】本発明はさらに、配列番号2に示される23位～420位のアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼA又はその誘導体を提供する。本発明はさらにまた、上記のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼA又はその誘導体をコードするDNAをも提供する。

【0013】本発明はまた、配列番号2に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する、カンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼA又はその誘導体を提供する。本発明はさらに、上記のカンジダ・ボイジニ株由来の前駆体プロテイナーゼA又はその誘導体をコードするDNAをも提供する。具体的には、該DNAは配列番号3に示される塩基配列を有することができる。

【0014】本発明はまた、配列番号5に示されるアミノ酸配列、あるいはその配列において少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有するように1個以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつプロテアーゼ活性を有するカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼB又はその誘導体を提供する。本発明はさらに、上記のカンジダ・ボイジニ株由来のプロテイナーゼB又はその誘導体をコードするDNAをも提供する。具体的には、該DNAは配列番号6に示される塩基配列を有する。

【0015】カンジダ・ボイジニ株のプロテイナーゼA、B又は前駆体プロテイナーゼA、B及びそれらをコードするDNAは、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) のプロテイナーゼA、B及びそれらをコードするPEP4、PRB1遺伝子と配列上の類似性をもつが、そのアミノ酸及びDNA配列は*Saccharomyces cerevisiae*や*Pichia pastoris*のプロテイナーゼA及びPEP4、PRB1遺伝子とはともに80%より低い相同性を有し本質的に異なるものである。それゆえ、本発明における上記の「誘導体」は、目的とするプロテアーゼ活性が得られる限り、及び／又は、配列番号2、3又は配列番号5、6に示される配列に、それらの配列と少なくとも80%、

好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の相同性を有する限り、置換、欠失、挿入又は付加等の変異を含み得ることを意味する。また、本発明の誘導体には、配列番号2又は5に示されるアミノ酸配列と本質的に同一のアミノ酸配列をコードする任意の塩基配列をもつDNAや染色体上の相同遺伝子を破壊するのに十分な相同性をもつDNA配列も含まれる。例えば、配列番号3で示される塩基配列の第6番目の「g」が「a」に置換されても、本発明の目的とするプロテアーゼ活性が得られる限り、かかる置換された配列も本発明に含まれることを意味する。この点で、本発明の誘導体は、タンパク質及びDNAの両方において、配列番号2、3、5又は6に示されるアミノ酸配列又は塩基配列を実質的に含む配列を有する、と表現することも可能である。本発明はまた、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる、カンジダ・ボイジニ由来プロテイナーゼAの分泌シグナルペプチドを提供する。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】本発明により、カンジダ・ボイジニのプロテアーゼをコードする塩基配列が該プロテアーゼの産生が少なくとも抑制されるように改変（置換、欠失、挿入、付加、等）されたDNA、好ましくは該プロテアーゼをコードする塩基配列に形質転換マーカー遺伝子が挿入されたDNA、並びに該改変DNAを有することによりタンパク質分解活性が親株に対して著しく低下したプロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株が提供される。

【0017】このような株の例としては、野生型のプロテイナーゼAをコードするPEP4遺伝子が上述のように改変されたPEP4遺伝子で置換されたカンジダ・ボイジニ株であり、該株では野生型プロテイナーゼAを全く産生しないのみならず、本来、プロテイナーゼAにより活性化されるカルボキシペプチダーゼYやプロテイナーゼBなどのプロテアーゼ活性も著しく抑制されている。また、PEP4遺伝子に加えてプロテイナーゼBをコードするPRB1遺伝子が上述のように改変されたPRB1遺伝子で置換されたカンジダ・ボイジニ株も作出可能であり、このような二重変異株においては、PEP4遺伝子欠失株ではわずかに活性が残存するとされるプロテイナーゼB活性も全く検出されないことが期待される。プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株、PEP4遺伝子欠失株とPEP4、PRB1遺伝子欠失株は、栄養培地を用いた培養条件下で野生株と同等の増殖能力を保持しているという特徴を有する。このことはこれらの遺伝子の有無は栄養条件下ではカンジダ・ボイジニの増殖に影響を及ぼさないことを意味する。従って本発明によるプロテアーゼ活性の抑制された酵母は異種タンパク質生産のための優れた宿主である。特に当該酵母はプロテアーゼ感受性の異種タンパク質を効率的に生産することができる。

【0018】本発明により、さらに、上記の本カンジダ・ボイジニ株を異種タンパク質をコードする遺伝子（即ち、異種遺伝子）を含む発現ベクターで形質転換して得られた形質転換体を培養し、菌体又は培養上清から目的タンパク質を回収することを含む、異種タンパク質の製造方法が提供される。ここで異種遺伝子とは、発現の対象となる任意の遺伝子を意味し、例えば、カテプシンC、表皮増殖因子（EGF）、インシュリン様増殖因子1（IGF-1）、ヒト血清アルブミン、エリスロポイエチン（EPO）、スロンボポイエチン（TPO）等が挙げられるが、これらに限定されない。また、異種遺伝子はいかなる手法によって得られるものであってもよい。

【0019】また、発現ベクターは、異種タンパク質の分泌のためのシグナルペプチド配列をコードするDNAを、該異種タンパク質をコードする遺伝子の5'末端に隣接（即ち、フランキング）して含むことができる。これによって、発現によって生成した異種タンパク質を細胞外へ分泌させることを可能とする。この分泌シグナルペプチドとしては、例えば、カテプシンCが本来有するシグナル配列、パン酵母の $\alpha$ 因子の分泌シグナルペプチド配列、カンジダ・ボイジニのプロテイナーゼAのシグナルペプチドが利用できる。

【0020】本発明の実施態様において、異種遺伝子として、ウシ由来のジペプチジルプロテアーゼであるカテプシンCをコードする遺伝子が例示される。本酵素は、タンパク質のN末端からアミノ酸を2つつつ分解するプロテアーゼであり、産業上有用な酵素である。この新規遺伝子は配列番号8に示されたアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質であると特徴付けられる。カテプシンCは不活性の前駆体（プレプロ体）として発現し、その後のプロセッシングにより分泌シグナルとして機能するプレペプチド領域が切断され、続いてプロペプチド領域が切断されて活性を有する成熟タンパク質になる。プロペプチド領域とは一般にタンパク質の不活性前駆体に含まれるペプチド断片であり、不活性前駆体から該ペプチドが特異的なプロテアーゼ等により切断除去されてそのタンパク質特有の活性を示す。従ってウシカテプシンCのプロペプチド配列とそれに続く成熟タンパク質を構成するポリペプチド配列が、該酵素の分泌過程での活性化にとって必要である。このために、該酵素の酵母における分泌発現には、分泌のためのシグナル配列をカテプシンCのプロペプチドのN末端に付加することが必要である。この分泌シグナルペプチドとしては上記例示のもの、好ましくはカンジダ・ボイジニのプロテイナーゼAのシグナルペプチドを利用できる。また該タンパク質の発現にとって、上記のプロテアーゼ遺伝子欠損株は特に有用であった。

【0021】従って、本発明には、カテプシンCを生産するカンジダ・ボイジニ株、好適にはプロテアーゼ活性

の低下したカンジダ・ボイジニ株、並びに、プロテアーゼ活性の低下したカンジダ・ボイジニ株を用いたウシ由来カテプシンCの製造方法も包含される。以下、本発明をさらに詳細に説明する。

【0022】本発明者らは上記課題を解決するために、

（1）カンジダ・ボイジニのプロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子の塩基配列を解明し、（2）プロテアーゼ遺伝子破壊プラスミドを構築し、（3）本プラスミドを用いて形質転換体を作製し、プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株を取得した。さらに（4）プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株を宿主として異種遺伝子を発現させた時、その生産量が野生株を宿主としたときよりも優れていることを確認し、本発明を完成するに至ったものである。

【0023】（1）プロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子

本発明の遺伝子を取得するための出発材料としては、カンジダ・ボイジニATCC48180株が例示される。本発明においてクローニング工程は、公知の方法(Molecular Cloning (1989), Methods in Enzymology 194 (1991))に従って行なうことが出来る。すなわち、（a）上記酵母の全DNAに由来するDNA断片、もしくは上記酵母のmRNAより合成されたcDNA断片を組み込んだ遺伝子導入用ベクターを宿主に導入して上記酵母の遺伝子ライブラリーを作製する。（b）ついで、かかる遺伝子ライブラリーから所望のクローンを選択して、当該クローンを増幅することにより上記のクローニング工程を実施することが出来る。

【0024】（a）酵母の遺伝子ライブラリーの調製

酵母の全DNAの抽出は、例えば酵母のプロトプラストを調製して、当該プロトプラストから、通常公知のDNA抽出法、すなわち細胞残さを除去した後、高塩濃度下でDNAをアルコール沈殿し、さらにフェノールやクロロホルム抽出後にアルコール沈殿して精製する方法を用いて行なうことが出来る。なお、上記の予めプロトプラストを調製する方法の他に、ガラスビーズ等による細胞破碎法等によってもDNAの抽出を行なうことが出来るが、高分子量のDNAを調製することが容易であるという点から上記プロトプラスト法を行なうのが好ましい。得られた染色体DNAを適当な制限酵素によって消化し、適当なベクターに連結した後、適当な大腸菌宿主に形質転換することによってゲノミックライブラリーを得ることができる。

【0025】この際用いられるベクターとしては、通常公知の遺伝子ライブラリー調製用ベクターとして知られる、pBR系統、pUC系統、ブルースクリプト（Blue script）系統等の一般に市販されている入手可能なプラスミドを用いることも出来る。また、gt系統やEMBL系統のファージベクターあるいはコスミド等も広く用いることが出来る。調製した遺伝子ライブラ

リー作製用ベクターで形質転換もしくは形質導入を行なう宿主は、上記ベクターの種類に応じたものを採用することが出来る。

#### 【0026】(b) クローンの選択

上記遺伝子ライブラリーから、所望のプロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子を有するクローンをそれぞれの遺伝子に特有の配列を含む標識プローブを用いてコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法等により選択し、取得することが出来る。

【0027】プローブに用いるプロテイナーゼA及びプロテイナーゼB遺伝子に特有の配列は、各種起源のプロテアーゼで保存されているアミノ酸配列より、カンジダ・ボイジニのコードン使用頻度を参考にプライマーを設計し、カンジダ・ボイジニの染色体DNAを鋳型とするPCR法により、所望するDNA断片を特異的に増幅して取得される。またカンジダ・ボイジニから精製した該プロテアーゼのアミノ酸配列に対応する2組のオリゴヌクレオチドを合成し、それらをプライマーとしてカンジダ・ボイジニの染色体DNAを鋳型とするPCR法により、所望するDNA断片を特異的に増幅して取得することも可能である。なお、合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いることもできる。

【0028】上記方法により得られる所望の遺伝子の塩基配列の決定および確認は、例えばマクサム・ギルバートの化学改変法(Maxam-Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980))やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. と Vieira, J., *Gene*, 19, 269 (1982))及びその自動化された変法等により行ない得る。

#### 【0029】(2) プロテアーゼ遺伝子破壊プラスミドの構築

プロテアーゼをコードするDNA配列を改変して、機能的プロテアーゼタンパク質が産生できないようにされたDNA、選択マーカー遺伝子等と共に適当なベクターの中に挿入され、遺伝子破壊プラスミドとして使用される。本プラスミドを用いた部位特異的組み込みにより、染色体上の該遺伝子が置換されることにより作製することができる。ここで用いる機能的プロテアーゼタンパク質が産生できないように改変されたDNA配列とは、タンパク質をコードするDNA配列の塩基が置換されたものか、一部分を欠失するか又は少なくとも1つのヌクレオチドが挿入(若しくは付加)されたものであり、これらの改変によってタンパク質をコードするDNA配列の読み枠がずれて発現されないか、発現されても得られる生成物の機能が変異することにより、本来のプロテアーゼ活性を有するタンパク質をコードできなくなる。好ましくはこのような改変されたDNA配列は、タンパク質をコードするDNA配列中に形質転換マーカー遺伝子などを挿入することによって作製することができる。このようなDNA断片を用いて染色体上の遺伝子を破壊する

ことができると共に導入された形質転換マーカー遺伝子を指標として改変されたプロテアーゼ遺伝子を有する変異体をスクリーニングできるという利点がある。ここで使用される選択マーカー遺伝子としては、G418等の抗生物質耐性遺伝子、URA3、LEU2等の宿主の栄養要求性を相補する遺伝子が例示される。発現ベクターの構成成分をベクターに挿入することは、後記実施例の記載を参照して、あるいは慣用の技術により当業者が容易に実施することが可能である。

#### 10 【0030】(3) プロテアーゼ遺伝子欠失カンジダ・ボイジニ株の取得

プロテアーゼ活性が野生型株に比較して抑制されたカンジダ・ボイジニ株は、上述の機能的なプロテアーゼタンパク質が産生できないように改変されたDNA配列を用いて適切な酵母宿主を形質転換して内在性の遺伝子を置き換えることにより作製することができる。このための方法としては、遺伝子置換によって染色体上の標的遺伝子を物理的に除去して改変遺伝子と置換する方法がある。これは、標的遺伝子の5'側と3'側の領域と相同的な末端配列を有する直鎖状DNA断片、好ましくは、形質転換マーカー遺伝子などの挿入により分断された遺伝子を含む改変DNA断片を用いて酵母宿主を形質転換することにより達成される。この形質転換マーカー遺伝子として好ましくは自発的な組換えにより染色体から除去され得る改変したURA3遺伝子を用いることができる。この改変したURA3遺伝子とは、その5'側と3'側とに相同なDNA配列を同一方向に配置した構造としている。これにより、酵母染色体上に組み込まれた後にこの反復配列間での自発的な組換えが生じてURA3遺伝子が抜け落ちることが可能であり、形質転換遺伝子マーカーとしてURA3遺伝子を再利用することが可能となる。この際、Ura<sup>-</sup>株は5-フルオロオロチン酸(5-FOA)耐性となることから、5-FOA感受性のUra<sup>+</sup>株の中からURA3遺伝子が自発的な相同組換えにより抜け落ちたUra<sup>-</sup>株の選択は容易である。

【0031】また、この他の方法としてポップイン・ポップアウトとも呼ばれる方法(Rothstein R., *Methods Enzymol.*, 194, 281 (1991))を用いてもよい。これは相同組換えにより改変遺伝子を含むプラスミドDNAを標的遺伝子座に導入した後、形質転換後に生じた内在性の標的遺伝子の一部と形質転換に用いた改変遺伝子の一部とからなる2つの遺伝子の間で起きる自発的な相同組換えにより機能遺伝子が除去され、改変された遺伝子が残された株を選択するという方法である。この選択法においてもURA3遺伝子をマーカーとして用いることにより、5-FOA感受性のUra<sup>+</sup>株の中からURA3遺伝子が自発的な相同組換えにより抜け落ちたUra<sup>-</sup>株の選択は容易である。

【0032】カンジダ・ボイジニを形質転換するための方法としては、プロトプラスト法や酢酸リチウム、電気

パルス法などを用いることができる。形質転換に用いるカンジダ・ボイジニ株については特に制限されないが、ATCC 48180株や、IFO 10035株等が例示される。また、さらにこの好ましくは少なくともひとつの栄養要求性マーカー遺伝子が欠失した株であり、URA3遺伝子欠失株やLEU2遺伝子欠失株等が例示される。

#### 【0033】(4) 異種遺伝子の発現

異種遺伝子は、転写の読み枠の方向にプロモーター配列、異種タンパク質の構造遺伝子、ターミネーター配列を有する発現ユニットと選択マーカー遺伝子等と共に適当なベクターの中に挿入された異種遺伝子発現ベクターを適当な宿主細胞に導入されることによって行われる。プロテアーゼ遺伝子欠失型カンジダ・ボイジニ株を用いる場合、上記のようにプロテアーゼ遺伝子を破壊し、次に異種タンパク質をコードするDNAで形質転換する。もしくはすでに目的とする異種遺伝子発現ベクターで形質転換された株を後から上記のようにプロテアーゼ欠損株を取得することも可能である。さらに異種遺伝子発現ベクターと上記の改変されたプロテアーゼ遺伝子で同時に形質転換することも可能である。

【0034】組換え異種タンパク質発現のためのプロモーターとしてはカンジダ・ボイジニのアルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーター（特開平5-344895号公報）、ギ酸脱水素酵素遺伝子のプロモーター（国際公開第W0 97/10345号）等が例示される。ターミネーターとしては、カンジダ・ボイジニのアルコールオキシダーゼ遺伝子のターミネーター（特開平5-344895号公報）、ギ酸脱水素酵素遺伝子のターミネーター、アクチン遺伝子のターミネーター（国際公開第W0 97/10345号）等が例示される。なお、異種タンパク質N末端に分泌のためのシグナル配列を連結することにより、異種タンパク質の分泌が可能になる。このような分泌のためのシグナル配列としては本発明で提供されるプロテイナーゼAの分泌シグナルペプチド配列のほか、パン酵母（*S. cerevisiae*）の $\alpha$ 因子の分泌シグナルペプチド配列等が使用できる。

【0035】発現ベクターは宿主染色体DNAに組み込ませたり、宿主細胞内で自己複製可能な自律性複製配列を有するベクターを用いて、プラスミド状態で存在させる。宿主細胞内に存在する異種遺伝子のコピー数は1コピーでも複数であってもよい。このようにして得られた形質転換体を培養し、得られる培養物から精製することにより、目的とする遺伝子発現産物を取得することができる。

【0036】培地としては、メタノール、グリセロール、グルコース等の1種以上の炭素源、及び酵母エキス、トリプトン、肉エキス、ペプトン、カザミノ酸、アンモニウム塩等の1種以上の窒素源に、リン酸、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、銅、

マンガン、コバルト等の無機塩類を添加し、さらに必要に応じて各種ビタミン、アミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素を便宜添加したものが挙げられる。

【0037】培地のpHは、5～8の範囲が好ましい。また培養温度は通常15～37℃、好ましくは28℃前後である。培養時間は24～1000時間程度であり、培養は静置、振とう、攪拌、通気下の回分培養又は連続培養により実施することができる。培養終了後、該培養物より遺伝子産物を採取するには、通常のタンパク質精製手段を用いることができる。例えば、形質転換細胞内に生産された場合は、常法により菌体を超音波処理、磨砕処理、加圧破砕等により遺伝子産物を含む粗蛋白質溶液を取得する。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する。培養上清中に生産された場合、培養液そのものから遺伝子産物を回収することができる。得られた溶液をろ過、遠心分離等により固形部分を除去し、粗タンパク質溶液を得る。必要によりプロタミン処理等による核酸の除去を行う。

【0038】粗タンパク質溶液から塩析法、溶媒沈殿法、透析法、限外ろ過法、ゲル電気泳動法、あるいはイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の精製手法を組み合わせることににより、目的タンパク質を分離精製することができる。

#### 【0039】

【実施例】本発明をさらに具体的に説明するために実施例を挙げるが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

<実施例1> Candida boidiniiの**プロテイナーゼA遺伝子(PEP4)のクローニング**  
*Candida boidinii* ATCC 48180株よりPEP4遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

#### 【0040】(1-1) プローブの作製

パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Woolford, C.A. et al., Mol. Cell. Biol. 6, 2500-2510 (1986)) 及びピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (特表平6-506117号公報) 由来のプロテイナーゼAで保存されているアミノ酸配列（一文字表記）：DFAEATSEPG L及びPYDYTELVSGSCIに対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを*Candida boidinii*のコードン使用頻度を考慮して以下のように合成した：

PRA5： 5'-GATTTYGCWGAAGCWA  
CWTCWGAACCGGGTTT-3'；及び  
PRA3： 5'-ATACAWGAWACTTCYA  
AWGTRTAATCCTAWGG-3'。

【0041】プライマーPRA5はアミノ酸配列DFAEATSEPG Lに対応し、プライマーPRA3はアミノ酸配列DFAEATSEPG Lに対応する塩基配列の



相補鎖の配列である。YPD培地（酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%、pH6.0）で培養した *Candida boidinii* ATCC48180株の菌体より、酢酸カリウム法 (Methods Enzymol., 65, 404 (1980)) によって染色体DNAを調製した。

【0042】*Candida boidinii*染色体DNAと、プライマーPrA5、PrA3を混合し、Ex Taqポリメラーゼ（宝酒造社）を用いたPCR（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で2分）×30サイクルを行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、pT7 Blue T-Vect（ノバジェン社）にクローニングした。Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いて、得られたプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を決定したところ、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* 由来のPEP4遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が認められたので、このDNA断片を *Candida boidinii* のPEP4遺伝子の一部であると断定した。0.6kbの挿入DNA断片は、プラスミドをSalIとEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

【0043】（1-2）ライブラリーの作製、及びスクリーニング

*Candida boidinii* ATCC48180株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNAをHybond N+ナイロンメンブレン（アマシャム社）トランスファーした。実施例（1-1）で得られたDNA断片をメガプライマーDNAラベリングシステム（アマシャム社）を用いて放射性標識し、サザンハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションは、常法 (Molecular cloning 2nd edn., ed. Sambrook, J., et al., Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A., 1989) に従って行った。結果、約5.5kbのEcoT22I断片にPEP4遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作製した。*Candida boidinii* の染色体DNAをEcoT22Iで切断し、アガロース電気泳動後、5.5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をPstIで切断したpUC118とライゲーションした後、Hanahanの方法 (Gene, 10, 63 (1980)) で大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作製した。

【0044】これらライブラリーを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた陽性クローンの中から、プラスミドpCPRA1及び挿入断片が逆方向であるpCPRA2を保持するクローンを選抜した。

【0045】（1-3）塩基配列決定

プラスミドpCPRA1の制限酵素地図を作製した（図1）。プラスミドpCPRA1を種々の制限酵素で切断し、サザンハイブリダイゼーションによる解析を行った結果、PEP4遺伝子は図1の約3.5kbのBglII-EcoT22I領域に存在すると考えられた。本領域の塩基配列の決定を行うために、2.2kbのBglII-EcoRV断片（図1で下線で示されたBglIIとEcoRV間の領域）を平滑末端化した後、pUC18のSmaI部位に、1.7kbのHindIII断片（図1で下線で示されたHindIII間の領域）をpBluescript II SK+のHindIII部位に、それぞれ両方向でクローニングした。それぞれのプラスミドより欠失変異体を、double-stranded Nested Deletion Kit（ファルマシア社）を用いて取得した。塩基配列をDye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit 及びDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いて決定した。得られた塩基配列をつなぎ合わせることで、配列番号1に示す塩基配列が得られた。

【0046】配列番号1の塩基配列には、1009番目から始まり、2271番目で終わる1263塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号2）と、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* 由来のプロテイナーゼAとの相同性を調べたところ、それぞれ75%、68%のアミノ酸が同一であった。シグナル配列切断点予測 (von Heijne, Nucleic Acids Res., 14, 4683 (1986)) により推定されるシグナルペプチドはメチオニンから22番目のアラニンまでの22アミノ酸であった。

【0047】＜実施例2＞ *Candida boidinii* のプロテイナーゼA遺伝子 (PEP4) 破壊株の作製

*Candida boidinii* のURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、PEP4遺伝子を破壊した。宿主として、*Candida boidinii* ATCC48180株のURA3遺伝子の変異株 *Candida boidinii* SK612株を用いた。*Candida boidinii* SK612株は公知の方法 (Sakai Y. et al., J. Bacteriol., 173, 7458 (1991)) に従って取得した。

【0048】（2-1）PEP4遺伝子破壊ベクターの作製

図2に示すように、PEP4遺伝子の約2kbのSnaBI-EcoRV領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDPRA1を作製した。PEP4遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、Sakaiらの報告 (Sakai Y. et al., J. Bacteriol., 174, 7



458 (1992)) に基づき、構造遺伝子の前後に、反復構造を持った URA3 遺伝子をマーカーとして用いた。

【0049】 *Candida boidinii* の URA3 遺伝子 (Sakai Y. et al., J. Ferment. Bioeng., 73, 255 (1992)) を含む 2.6 kb の Sal I-Pst I 断片を、pBluescript II SK- の Sal I と Pst I 部位の間に挿入した pCBU3 を作製した。pCBU3 を Sal I で切断し、T4 DNA ポリメラーゼにより平滑末端処理した後、さらに Xba I で切断して、0.9 kb の URA3 遺伝子の 5' 側を含む DNA 断片を単離した。また pCBU3 を Pst I で切断し、T4 DNA ポリメラーゼにより平滑末端処理した後、さらに Kpn I で切断して得られた 2.6 kb の DNA 断片と前述の 0.9 kb の DNA 断片を pUC19 の Kpn I-Xba I に挿入し、プラスミド pURP を得た。その結果、pURP を Sal I で切断して得られる 3.5 kb の DNA 断片には、URA3 構造遺伝子の前後に約 0.9 kb の反復配列が存在することになる (図 2)。

【0050】 pCPRA1 と逆向きに PEP4 遺伝子が挿入された pCPRA2 を SnaBI と EcoRV で切断し、XhoI リンカー (宝酒造社) を挿入した。得られたプラスミドの XhoI 部位に pURP を Sal I で切断して得られる 3.5 kb の DNA 断片を挿入し、プラスミド pDPRA1 を得た (図 2)。

【0051】 (2-2) 形質転換

本実施例の (2-1) で得られた pDPRA1 を Sal I で切断して、*Candida boidinii* SK612 株に酢酸リチウム法 (Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153, 163 (1983)) で形質転換を行った。得られた形質転換体についてその染色体 DNA のサザン解析を行うことにより、PEP4 遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主 SK612 株及び形質転換株の染色体 DNA を Sal I と Nde I で切断し、pCPRA1 を Sal I と SnaBI で切断してえられる 1.7 kb の DNA 断片をプローブとしてサザン解析を行った (図 3)。図 3 に示すように宿主 SK612 株では 3.8 kb にバンドが検出されるが、破壊株では 5.4 kb の位置にバンドが検出される。

【0052】 該破壊株を *Candida boidinii* SK740 株と命名した。*Candida boidinii* SK740 株を YPD 培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸 (5-FOA) に耐性を示す株を取得した。5-FOA 耐性株の取得は実験書 (石田功、安東民衛/編、遺伝子発現実験マニュアル、講談社サイエンティフィク、1994) に記載の方法に従った。5-FOA 耐性株の染色体 DNA を PEP4 遺伝子破壊株を取得した際と同様のサザン解析を行うことによって、URA3 遺伝子が欠落した株をスクリーニングした。図 3 に示すように SK740 株では 5.

4 kb の位置に検出されるバンドが、URA3 遺伝子が欠落した株では 2.8 kb の位置にバンドが検出された。URA3 遺伝子が欠落した酵母を *Candida boidinii* SK741 株と命名し、平成 10 年 9 月 1 日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県、つくば市) にブタペスト条約下に国際寄託され、受託番号 FERMBP-6482 が与えられた。

【0053】 <実施例 3> *Candida boidinii* のプロテイナーゼ B 遺伝子 (PRB1) のクローニング

*Candida boidinii* ATCC48180 株より PRB1 遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(3-1) プローブの作製

*Saccharomyces cerevisiae* (Moehle, C.M. et al., Mol. Cell. Biol. 7, 4390-4399 (1987)) 及び *Pichia pastoris* (特表平 6-506117 号公報) 由来のプロテイナーゼ B で保存されているアミノ酸配列 (一文字表記): GNGHGHCAAGT 及び ATAVLSGT SMA に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを *Candida boidinii* のコドン使用頻度を考慮して以下のように合成した:

【0054】 PRB5: 5'-GGTAAYGGTCAYGGTACHCAYTGTGCHGGWAC-3'; 及び

PRB3: 5'-GCCATWGAAGTAGCWGATAARACDGCWGTGDC-3'。

【0055】 プライマー PRB5 はアミノ酸配列 GNGHGHGHCAAGT に対応し、プライマー PRB3 はアミノ酸配列 ATAVLSGT SMA に対応する塩基配列の相補鎖の配列である。*Candida boidinii* ATCC48180 株の染色体 DNA と、プライマー PRB5、PRB3 を混合し、Ex Taq ポリメラーゼ (宝酒造社) を用いた PCR (94℃で 30 秒、50℃で 1 分、72℃で 2 分) × 30 サイクルを行った。増幅された約 0.5 kb の DNA 断片を回収し、pT7Blue T-Vector (ノバジェン社) にクローニングした。Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて、得られたプラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列を決定したところ、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* 由来の PRB1 遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が認められたので、この DNA 断片を *Candida boidinii* の PRB1 遺伝子の一部であると断定した。0.5 kb の挿入 DNA 断片は、プラスミドを Sal I と EcoRI で切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

17

【0056】(3-2)ライブラリーの作製、及びスクリーニング

*Candida boidinii* ATCC4818 0株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNAをHybond N+ナイロンメンブレン(アマシャム社)トランスファーした。本実施例の(3-1)で得られたDNA断片をメガプライマーDNAラベリングシステム(アマシャム社)を用いて放射性標識し、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、PRB1遺伝子は約5.5kbのEcoRI-HindIII断片、約4.5kbのBglII-EcoT22I断片に存在することが示された。次に、約5.5kbのEcoRI-HindIII断片、約4.5kbのBglII-EcoT22I断片をクロニングすべく、ライブラリーを作製した。*Candida boidinii*の染色体DNAをEcoRIとHindIIIで切断し、アガロース電気泳動後、5.5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をpUC19のEcoRIとHindIII部位の間に挿入し、EcoRI-HindIIIプラスミドライブラリーを作製した。同様にBglII-EcoT22I断片をpBluescript II SK+のBamHIとPstI部位の間に挿入したBglII-EcoT22Iプラスミドライブラリーを作製した。

【0057】これらライブラリーに上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。オートラジオグラフィーによって、EcoRI-HindIIIプラスミドライブラリーからpCPRB1、BglII-EcoT22IプラスミドライブラリーからpCPRB2を保持するクローンが陽性クローンとして選抜された。

【0058】pCPRB1及びpCPRB2の制限酵素地図を作製した(図4)。得られたクローンが*Candida boidinii*のPRB1遺伝子であることを確認すること、及び*Candida boidinii*のPRB1遺伝子のオープンリーディングフレームの位置及び方向を推定することを目的として、前述したゲノミックサザン解析によりプローブがハイブリダイズした最小のDNA断片の約0.7kbのClaI領域の塩基配列を決定した。この塩基配列の決定はpCPRB2より取得した0.7kbのClaI断片を、pBluescript II SK+に挿入して作製したプラスミドを用いて行った。得られた塩基配列(配列番号6)から推定されるアミノ酸配列(配列番号5)と、*Saccharomyces cerevisiae*及び*Pichia pastoris*由来のプロテイナーゼBとの相同性を調べたところ、それぞれ76%、77%のアミノ酸が同一であった。この結果より*Candida boidinii*のPRB1遺伝子のオープンリーディング

18

グフレームは図4の矢印で示した領域に存在することが推定された。

【0059】<実施例4> *Candida boidinii*のプロテイナーゼB遺伝子(PRB1)破壊株の作製

*Candida boidinii*のURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、PRB1遺伝子を破壊した。宿主として、実施例2で取得した*Candida boidinii* SK741株を用いた。

(4-1) PRB1遺伝子破壊ベクターの作製

PRB1遺伝子の約0.7kbのClaI領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDPRB1を次のように作製した。

【0060】pCPRB2をClaIとEcoRIで切断して得られた約2.0kbのDNA断片を、pCPRB1のClaI-EcoRI領域に挿入した。得られたプラスミドをpCPRBΔClaIと命名した。pCPRBΔClaIをClaIで切断し、T4 DNAポリメラーゼによる平滑末端処理した後、XhoIリンカーを挿入した。得られたプラスミドのXhoI部位に実施例2の(2-1)に記載のpURPをSalI切断して得られる3.5kbのDNA断片を挿入し、プラスミドpDPRB1を得た(図5)。

【0061】(4-2)形質転換

本実施例の(4-1)で得られたpDPRB1をHincIIとEcoRIで切断して、*Candida boidinii* SK741株に酢酸リチウム法で形質転換を行った。得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、PRB1遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主SK741株及び形質転換株の染色体DNAをBglIIとHindIIIで切断し、pCPRB1をClaIとBglII切断して得られる1.3kbのDNA断片をプローブとしてサザン解析を行った(図6)。図6に示すように宿主SK741株では3kbの位置に検出されるバンドが、破壊株では5.8kbに検出される。

【0062】該破壊株を*Candida boidinii* SK774株と命名した。*Candida boidinii* SK774株より5-FOA耐性株を取得し、URA3遺伝子が欠落した株をスクリーニングした。スクリーニングはサザン解析によって行った。図6に示すようにSK774株では5.8kbの位置に検出されるバンドが、URA3遺伝子が欠落した株では3.2kbの位置に検出された。該酵母を*Candida boidinii* SK775株と命名した。

【0063】<実施例5> プロテアーゼ欠損株のプロテアーゼ活性の測定

実施例2の(2-2)で得られた*Candida boidinii* SK740 (pep4)株及び実施例4の(4-2)で得られた*Candida boidi*

nii SK774 (pep4, prb1) 株、および *Candida boidinii* ATCC48180 株の示すプロテアーゼ活性を測定した。それぞれの株を2mlのYPD培地で、30℃で定常期まで培養した。集菌した菌体を0.2mlの100mM Tris-HClバッファー (pH 7.5) に懸濁し、0.8gのガラスビーズ (0.425-0.6mm、シグマ社) を加え、1分間激しく攪拌後、1分間水冷するという操作を5回繰り返した。菌体破碎液を4℃、10000回転にて10分間遠心し、上清画分を無細胞抽出液として取得した。プロテインアッセイキット (パイオ・ラッド社) を用いて、無細胞抽出液のタンパク質濃度を測定した。

【0064】無細胞抽出液の酵素活性は、Jonesの総説 (Jones, E. W., Methods Enzymol., 194, 428 (1991)) に従い、プロテイナーゼA活性及びカルボキシペプチダーゼY活性を測定した。すなわち、プロテイナーゼA活性は、25μlの無細胞抽出液、終濃度100mM Glycine-HCl バッファー (pH 3.2)、1%の酸変性ヘモグロビンを含む1mlの反応液中で37℃で測定した。0分後、10分後、20分後、30分後にそれぞれ200μlの反応液を抜き取った後、100μlの1N過塩素酸を加え、10000回転にて10分間遠心した。上清100μlを抜き取り、50μlの0.5M NaOHを加え、本溶液中の遊離ペプチド含量をDCプロテインアッセイキット (パイオ・ラッド社) を用いて測定した。プロテイナーゼA活性は、1分間に1μgのペプチドを遊離する酵素量を1ユニットと定義した。ATCC48180株では無細胞抽出液1mg当たり49.3ユニットのプロテイナーゼA活性が検出されたが、SK740株及びSK774株では活性は検出されなかった。

【0065】カルボキシペプチダーゼY活性は、100μlの無細胞抽出液と500μlのバッファー (100mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM CaCl<sub>2</sub>) 及び20μlの基質溶液 (ジメチルホルムアミドで溶解させた6mM N-ベンゾイル-L-チロシン-p-ニトロアニリド (シグマ社)) を混合して、よく攪拌した後、37℃で30分間反応した。これに600μlの1.5M 酢酸を加え、反応を停止し、0.22μmのフィルターでろ過し、405nmにおける吸光度を測定した。カルボキシペプチダーゼY活性は、1分間に1nmolのp-ニトロアニリンを遊離する酵素量を1ユニットと定義した。ATCC48180株、SK740株、SK774株が示す無細胞抽出液1mg当たりそれぞれ、0.72ユニット、0.28ユニット、0.05ユニットのカルボキシペプチダーゼY活性が検出され、プロテアーゼ遺伝子欠損により、カルボキシペプチダーゼY活性が大幅に減少することが確認された。

【0066】＜実施例6＞ 異種遺伝子タンパク質の分

## 泌生産

プロテアーゼ遺伝子が破壊された *Candida boidinii* 株を用いてウシ由来カテプシンC遺伝子を発現することにより、カテプシンCの分泌量が増大することを確認した。また実施例1の(1-3)で得られたPEP4遺伝子のプレ配列が異種遺伝子タンパク質を分泌させるためのシグナル配列として機能することも確認した。

【0067】(6-1) ウシ由来カテプシンC遺伝子のクローニング

既に報告されているヒト由来カテプシンC遺伝子をPCRにて取得し、得られたDNA断片をプローブとして用いた。ヒトカテプシンC遺伝子の塩基配列 (Patris, A. et al., FEBS Lett., 369, 326 (1995)) に従い、以下のオリゴオリゴヌクレオチドを合成した:

HCat-5: 5'-CAAGGCTTTGAGATTGTGTTGAATGACTAC-3' 及び

HCat-3: 5'-TCTGAGATTGCTGCTGAAAGTCTACAGTCT-3'。

【0068】鋳型DNAとしてQUICK-Screen Human cDNA Library Panel (Clontech社) を用いた。鋳型DNAと、プライマーHCat-5、HCat-3を混合し、Ex Taqポリメラーゼ (宝酒造社) を用いたPCR (94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で2分) ×30サイクルを行った。胎盤由来のライブラリーから増幅された約1.2kbのDNA断片を回収し、pT7 Blue T-Vector (ノバジェン社) にクローニングした。Dye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて、塩基配列を決定し、ヒト由来カテプシンC遺伝子が挿入されていることを確認した。1.2kbの挿入DNA断片は、プラスミドをSmaIとXbaIで切断し、アガロース電気泳動後、回収し、プローブDNA断片として用いた。

【0069】ウシカテプシンC遺伝子を取得するためのライブラリーとして、ストラタジーン社から購入したBovine Spleen cDNAライブラリーを用いた。添付のプロトコールに従って出現させた約100万の組み換えファージクローンよりブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた6個の陽性組み換えファージとライブラリーに添付のヘルパーファージと共に、大腸菌XL1-Blue MRF' 株に感染させ37℃で3時間培養し、目的cDNA断片を有するpBluescriptを切り出した。培養液を70℃で20分間処理した上清液を大腸菌SOLR™株に感染させ、組み換えプラスミドDNAを有する大腸菌をアンピシリン耐性により選抜した。

【0070】6個の組み換えプラスミドをDye primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて、5'末端側、3'末端側の塩基配列

を決定した結果、最も長い cDNA 断片を有するクローンとして pBC20-2 を選抜した。Dye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社) を用いて pBC20-2 の挿入 DNA 断片の塩基配列を決定し、配列番号 7 に示す塩基配列を得た。得られた塩基配列より配列番号 8 に示すアミノ酸配列が得られた。この配列とヒトカテプシン C のアミノ酸配列を比較したところ、89% のアミノ酸が同一であった。プロ領域の N 末端は配列番号 8 の 20 番目のアスパラギン酸、成熟領域の N 末端は配列番号 8 の 226 番目のロイシンであると考えられた。pBC20-2 には開始メチオニンをコードする配列が含まれておらず、プレ領域の一部は欠損していると考えられた。

#### 【0071】(6-2) ウシカテプシン C 発現プラスミドの構築

本実施例の (6-1) で得られたウシカテプシン C を *Candida boidinii* を用いて分泌発現させるために、実施例 1 の (1-3) で得られたプロテイナーゼ A のプレ領域 (配列番号 4) をウシカテプシン C のプロ領域-成熟領域の N 末端側に連結した。またウシカテプシン C のプロ領域-成熟領域の塩基配列は、*Candida boidinii* において使用頻度の高いコドンを用いた塩基配列配列に変換した。さらに構造遺伝子の翻訳開始コドン (ATG) の 5' 上流側及び翻訳終止コドン (TAA) の 3' 下流側に Not I 認識部位が形成されるように設計した (配列番号 9)。設計した DNA は図 7 に示す方法で、PCR を用いて合成した。図 7 中の各プライマーの塩基配列を以下に示す：

A1F : 5'-GTACATATCCAGATCTAT  
TAGGTA CTTGGGTCTTTCAAGTTGG  
TTCTTCTG GTTCACAAAGAGATGTT  
AATTGTTCTGTTATGGGTCCTCCAG  
AGAAGAAAGTTGTCGTTCACTTAAA  
GAAACTTG-3' ;

A1R : 5'-GCAAACCATTTATAATCA  
TTCAAGACAATTTTCGAAACCTTGAT  
TATAGATAATAGTGAAATGACCAGA  
ATTACCAAAATCATCATAAGCAGTA  
TCAAGTTTCTTTAAGTGAACGACAA  
CTTTCTTC-3' ;

A2F : 5'-GGGGGGCGGCCGCGCATGAA  
GTTTCAACAATTCCTTTTTTCTGTCGCT  
TTCTCTATCTTAGCTGCTACTACTT  
TAGTTGATGCTGATACTCCAGCTAA  
TTGTACATATCCAGATCTATTAGGT  
ACTTGGG-3' ;

A2R : 5'-CCCCCACTAGTCCTAGGA  
CATCATGAACCCAACCTGTCATAGT  
TTCATGACAATAAGAAGTAACTTTA  
CCACCTTCTTCTTTATATTTAAAGA

AAGCAAACCATTTATAATCATTTCAA  
GACAATTTTCG-3' ;

B1F : 5'-CGTTAATACTGCTAGATT  
AGCTGGTTT TAGAAGAAACATACTCT  
AATAGATTATATCGTTATAATCATG  
ATTTTCGTCAAAGCTATTAAATGCTAT  
TCAAAAATCTTGGAC-3' ;

B1R : 5'-TACGAGAATGACCACCAC  
CTCTTCTAATCATTTCTTTAAGAGT  
TAATGTTTTCATATTCCATATAAGGA  
GCAGCAGTCCAAGATTTTTTGAATAG  
CATTAATAGCTTTTG-3' ;

B2F : 5'-GGGGGGCGGCCGCGGGGC  
CTAGGTAGAAATTGGGCTTGTTTCA  
CTGGTAGAAAGACTGGTAATACTTC  
TGAAAATGTTAACGTTAATACTGCT  
AGATTAGCTGGTTT TAGAAG-3' ;

B2R : 5'-CCCCCACTAGTAGGTAAG  
TGTAAGATTTTCTTCTGAATTTTCAG  
CAGTAATAGGTGCAGGTTTAGGTCT  
AGGTATTCTACGAGAATGACCACCA  
CCTCTTCTAATCA-3' ;

C1F : 5'-TTGCTTCTATGGGTATGA  
TGGAAGCTAGAAATTAGAAATTTTGAC  
TAATAATACTCAAACCTCCTATCTTA  
TCTCCACAAGAAGTTGTCTCTTGTT  
CTCAATATGCTCAAGGTTGTGAAGG  
TG-3' ;

C1R : 5'-ATGGAGAATCAGTACCAG  
TATATGGAAAACAATCTTCTTCAAC  
TAGACC AAAGTCCTGAGCATATTTA  
CCAGCAATTAAGTATGGGAAACAC  
CTTCACAACCTTGAGCATATTGAGA  
AC-3' ;

C2F : 5'-GGGGGACTAGTTGGGATT  
GGAGAAATGTTTCATGGTATTAACCTT  
TGTTACTCCTGTTAGAAATCAAGGT  
TCATGTGGTTCTTGTTACTCATTTG  
CTTCTATGGGTATGATGGAAGCTAG  
AATTAGAATTTTGAC-3' ;

C2R : 5'-CCCCCAAGCTTCATTACA  
ACCACCATAGAAACCAACACATAA  
TGATATTCAGAAGAGTAATATCTGA  
AACAACTTCTTTCAATCTACATGG  
AGAATCAGTACCAGTATATGGAAAA  
C-3' ;

D1F : 5'-ATTATAGAAAAGGTGTTT  
ATCATCACACTGGTTTAAGAGATCC  
ATTTAATCCATTTGAGCTCACTAAT  
CATGCTGTCTTATTAGTTGGTTATG

GTACTGATGCTGCTTCTG-3';  
 D1R: 5'-GTACCTCTTCTAATTCTA  
 AAGTAACCATTTTTCACCCCAAGAAG  
 TACCCCATGAGTTCTTAACAATCCA  
 ATAATCTAAACCAGAAGCAGCATCA  
 GTACCATAACCAACTAATAAG-3';  
 D2F: 5'-GGGGGAAGCTTTGATGAA  
 ATTAGAATTAGTTCATCAAGGTCCT  
 ATGGCTGTTGCTTTTGAAGTCTATG  
 ATGATTTCTTACATTATAGAAAAGG  
 TGTATTATCATCACACTG-3'; 及び  
 D2R: 5'-CCCCCTCGAGGCGGCCG  
 CTTATAATTTAGGAATAGGAGTAGC  
 AGCTAAAGCAATAGATTCAATAGCA  
 CATTTCATCAGTACCTCTTCTAATTC  
 TAAAGTAACCATTTTTC-3'.

【0072】領域Aは、まずプライマーA1FとA1Rを混合し、Ex Taqポリメラーゼ（宝酒造社）を用いたPCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で30秒）×20サイクル）を行い、2本鎖DNAを合成した。反応終了後、フェノール／クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、PCR反応液の2分の1容量（25μl）のTEバッファーに溶解した。この溶液2μlとプライマーA2FとA2Rを混合し、Ex Taqポリメラーゼ（宝酒造社）を用いたPCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で30秒）×20サイクル）を行った。増幅されたDNA断片を回収し、Not IとSpe Iで切断した後、pBluescript II KS+のNot I-Spe I間に挿入した。By

primer cycle sequencing FS Ready Reaction Kit（パーキンエルマー社）を用いて、領域Aが正しく合成されていることを確認した。得られたプラスミドをpCT-Aと命名した。

【0073】領域B、C、Dについても図7に示すプライマーを用いて領域Aと同様の方法で合成し、それぞれpBluescript II KS+に挿入したプラスミドpCT-B、pCT-C、pCT-Dを得た。pCT-Aから切り出したNot I-Sty I断片をpCT-BのNot I-Sty I間に挿入したプラスミドpCT-AB、pCT-Cから切り出したSpe I-Hind III断片をpCT-DのSpe I-Hind III間に挿入したプラスミドpCT-CDを作製した。pCT-CDから切り出したSpe I-Xho I断片をpCT-ABのSpe I-Xho I間に挿入し、プラスミドpCTC-S1を作製した。

【0074】pCBU3から切り出したCandida boidinii URA遺伝子を含む2.6 kbのSal I-Pst I断片とpFdhPT（WO97/10345）から切り出したCandida boidinii

ーター領域を含む2.1 kbのKpn I-EcoT22 I断片をpUC19のKpn I-Sal I間に挿入して、マーカー遺伝子がURA3遺伝子で、ギ酸脱水素酵素遺伝子プロモーター／ターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドpFexU3を作製した（図8）。pCTC-S1から切り出したカテプシンC遺伝子を含むNot I断片をpFexU3のNot I部位に挿入し、ウシカテプシンC発現プラスミドpECTC-S1を作製した（図8）。

#### 【0075】（6-3）形質転換

本実施例の（6-2）で得たプラスミドpECTC-S1をBamHIで切断し、Candida boidinii SK612株、SK741株に形質転換した。得られた形質転換体のコロニーを各宿主株につき10個拾い、培地中に分泌されるカテプシンC活性を測定した。まず、GLYS培地（グリセロール3%、Yeast Nitrogen Base 0.67%、Yeast Extract 0.5%を含むpH5.5の培地）中で30℃にて、48時間振とう培養した。3000回転、5分間の遠心で集菌した菌体をGLYS培地と等量のMYS（メタノール1.5%、Yeast Nitrogen Base 0.67%、Yeast Extract 0.5%を含むpH5.5の培地）に懸濁し、さらに30℃にて、48時間振とう培養した。培養後、3000回転、5分間の遠心によって取得した培養上清をマイクロコン-30（アミコン社）を用いて50倍濃縮し、以下に示す方法でカテプシンC活性を測定した。

【0076】2μlの濃縮培養上清と、200μlのバッファー（50mMクエン酸-クエン酸ナトリウムバッファー（pH5.0）、10mM NaCl、1mMβ-メルカプトエタノール、及び基質の4mM Glycyl-L-phenylalanine-p-nitroanilide（シグマ社、ジメチルホルムアミドで200mMに溶解させたものを希釈））を混合した後、37℃で2～10時間放置し、405nmにおける吸光度を測定した。標準品としてベーリンガー社から購入したウシカテプシンCの16、8、4、2、1、0.5μg/ml溶液を調製し、これを試料として作製した標準曲線から、各サンプルのカテプシンC活性を算出した。各形質転換株が示したカテプシンC生産量を図9に示す。図9に示すようにプロテアーゼ遺伝子が破壊されたCandida boidinii株を宿主として用いた場合の方が、カテプシンC生産性に優れていた。

#### 【0077】

【発明の効果】本発明によりプロテアーゼ（又はタンパク質分解）活性の減少したCandida boidinii株が提供され、この酵母を宿主とした発現系において目的タンパク質の分解を防ぐことにより該タンパク質の収率を向上させることができる。

\* \* 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Kirin Brewery Company, Limited

&lt;120&gt; Candida boidinii strains and use thereof as hosts for preparing heterologous proteins

&lt;130&gt; P98-0444

&lt;160&gt; 9

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3486

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 1

```

agatcttggg atacgcattc ttcgcacaac caccaaccac cagccttcca gcaactagcc      60
agcagccagc agcagaggcca aagatgtggc accggcatga aacaatggct gctgggtgcgg      120
aaacaactgc ggccaggtea catctcccat tgttttccac gcgctgtttc tcgattgggc      180
cttgtgagaa atacaaatag ggaaagcga acatacgtaa tgtatgcaat gtatgtaatg      240
tatgcaatta caattgttgc cctctctctt tctacggctc tttctatgac tctctctctt      300
gtatgaaccc cactggccct atctctgtcc tctgtgtctc tatctccatc ttcctctctt      360
cctcttctct ctgtctttgt cttatctaca catatcactc ttattctctt tgcctgcttg      420
ctcctccctt gaactgtgcc ctcctctccc tctctcttcc tctctcacc ttagtattgt      480
cttgccccaa tgcaaatctt aactccattt gcaatcacat tcacatttcc tctccattca      540
actcttctac ttgtctctc ttatcaatta attgattaat caatcacctt cctctctctt      600
tttactcttc tccattacc acatcttctt atcagctgtg ctccatcacc ttctccatca      660
aggccattat aaattaacgc ccaacaccat tgccatccat ccccatctat catacaacta      720
aagagtattc taatcaatcc atctcgttt gtcctctgtc ttcaatatca cacaagctaa      780
tcaattccct taaagaatta atctctttaa ttgtattgat agtcatttag cattcaccaa      840
aatttgataa gtatagaatc taagttataa aatataaaat agaacttttc tegtccaac      900
atttaaccgc ccatttccct aaaattaaag gtatataaat tacacaaatt caaccattaa      960
aaggaaaaaa aaagaaaaaa actacttctc aaaaagaaat ctttcgcaat gaagttcaca     1020
atcccttttt ctgtcgcttt cagtatctta gctgtacta ccttagttga tgccaaagtt     1080
cactcaattc caattaaaaa acactcttta gaagaaactt ttaaagatat ttcttataat     1140
gattatttag ctctttttaa gaataaatat atctcattat ataacaagca tcaactcaat     1200
aacgccgttg aatctattga aggtgatcaa caacaccctt ttatcccat cgttgaagtt     1260
gtcgatggtg aattcaaaga ttcaaaaact gatgtctctt taactaacta tatgaatgct     1320
caatatttca cagaaattca attaggtacc ccagggtcaag tctttaaagt tatcttagat     1380
accggttctt ccaatttatg ggtcccagggt aaggattgtt cttcttttagc ttgttactta     1440
cactcaaagt atgatcacga tgaatcttca acttataaga aaaacggtac cgaatttgc     1500
attagatatg gtactgggtc tttagaaggt tttgtctctt ctgatacttt aaccatttga     1560
gatttgggta tcccagatca aggttttgc gaagccactt ctgaaccagg tttaactttt     1620
gcctttggta aattcgatgg tatcttaggt ttagcttatg acactatctc tgtccagaaa     1680
gttgctctc cagtctataa agccattgat tcaggtttat tagacaaacc acaattttcc     1740
ttctacttag gtgataccgc taaatcagaa actgatgggtg gtgttgccac ttttgggtgt     1800
atcgatgaat cttaattcaa cggtaagctt acctgggtgc ctggttagaag aaaggcttac     1860
tggaaggttg cattcgatgg tgcggatta ggttctgaat atgtctcttt actaaatata     1920
ggcgcccca ttgatacagg tacctcttta atcgctttac catcaggttt agctgaaatc     1980

```

27

28

```

ttaaactctg aaattgggtgc cactaaatct tggctctggtc agtacactat cgattgtgcc 2040
gctagagatt ctctaccaga tttaaccttc acttttagctg gttacaattt caccattgggt 2100
ccttacgatt atactttaga agtttctgggt tcttgatctt cttctttcac tccaatggat 2160
atcccagctc caattgggtcc aatggctacc gttgggtgatg ccttcttaag aaaattctac 2220
tctgtttacg atttaggtaa agatgctggt ggtttagctc cagctatcta attctgatta 2280
gcttggaag ttattcatat attgcactat tcataatgct atataatacc ttctctttct 2340
attgttcaga ctctctttta tacttggtcc attattagct taaatgaaaa ataaatactt 2400
ttttgaaca aaaaatcatg tttatgatca gtgatgttt tgtctctga ttctctctc 2460
tattgaacca ttgttataat ttcattttt tcttgatcct tctttttct tttttttgtc 2520
tcacttttt aattttttt ttcggttcgg ttttcaaac aaaaaaaac ataattgtaa 2580
aagaatatta cttatattaa tttatactat attatattag attatattat attttaaac 2640
aaactaaatt aaataaacta taaataatta taaaagatca ttattgggtga ctttcaggaa 2700
atgcaatatt ataattatta tttcatgaa attgaccgtt actattagat tctccaagag 2760
atacagatga taattcaacc ctcttggtt tcttaaaagg ttgagaagaa gaaatcaaaa 2820
tatcttgatc tttatcttct tgttctaata actgttgctt tccatcttca ccatctctag 2880
ttgatttact catctcacta tatttctct tgggtttatc accaccgttg tacaaccct 2940
tctttcttct ctggaattc ttattgtcgc caccgttgtc accgctacca gaattggcat 3000
tggatttact tctgtaatgc tctgttgtt tgttattgtt agacacggca gatccaatat 3060
tagaagatgg atttattaca gagctgttaa tattcgataa tatatcacgt agatatttct 3120
tatecatatc atcatgcggt tcaatcctga ctctctctcc ttcatcgtcg ccagctaaac 3180
cggaagcacc aacatctgca acacgtcgtc ttgatcttt tgtcacattt tgttcactgt 3240
tgtaataact actgctgatg ctactgccat tgctactatt accgatattg ttgtttgact 3300
tattattacc atactcttt gacttcttct taccatttct gtataaacct gtaccatcgt 3360
taacttcaat cttataatcct aagtagtcca tattatttct atcgataaac aaatgaataa 3420
catctccatc aaaaattctt atcttatcc cctttttgat cctattacca ttgacataac 3480
atgcat 3486

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 420

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (23)···(420)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;220&gt; (1)···(22)

&lt;400&gt; 2

```

Met Lys Phe Thr Ile Pro Phe Ser Val Ala Phe Ser Ile Leu Ala Ala
  1             5             10             15
Thr Thr Leu Val Asp Ala Lys Val His Ser Ile Pro Ile Lys Lys His
      20             25             30
Ser Leu Glu Glu Thr Phe Lys Asp Ile Ser Tyr Asn Asp Tyr Leu Ala
      35             40             45
Ser Leu Lys Asn Lys Tyr Ile Ser Leu Tyr Asn Lys His His Ser Asn
      50             55             60
Asn Ala Gly Glu Ser Ile Glu Gly Asp Gln Gln His Pro Phe Ile Pro
      65             70             75             80

```



29  
 Phe Val Glu Val Val Asp Gly Glu Phe Lys Asp Ser Lys Thr Asp Ala  
 85 90 95  
 Pro Leu Thr Asn Tyr Met Asn Ala Gln Tyr Phe Thr Glu Ile Gln Leu  
 100 105 110  
 Gly Thr Pro Gly Gln Val Phe Lys Val Ile Leu Asp Thr Gly Ser Ser  
 115 120 125  
 Asn Leu Trp Val Pro Gly Lys Asp Cys Ser Ser Leu Ala Cys Tyr Leu  
 130 135 140  
 His Ser Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser Thr Tyr Lys Lys Asn Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Phe Ala Ile Arg Tyr Gly Thr Gly Ser Leu Glu Gly Phe Val  
 165 170 175  
 Ser Ser Asp Thr Leu Thr Ile Gly Asp Leu Val Ile Pro Asp Gln Gly  
 180 185 190  
 Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu Thr Phe Ala Phe Gly Lys  
 195 200 205  
 Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Thr Ile Ser Val Gln Lys  
 210 215 220  
 Val Val Pro Pro Val Tyr Lys Ala Ile Asp Ser Gly Leu Leu Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Gln Phe Ser Phe Tyr Leu Gly Asp Thr Ala Lys Ser Glu Thr Asp  
 245 250 255  
 Gly Gly Val Ala Thr Phe Gly Gly Ile Asp Glu Ser Lys Phe Asn Gly  
 260 265 270  
 Lys Thr Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys Ala Tyr Trp Glu Val Ala  
 275 280 285  
 Phe Asp Gly Val Gly Leu Gly Ser Glu Tyr Ala Pro Leu Thr Asn Thr  
 290 295 300  
 Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu Ile Ala Leu Pro Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ser Glu Ile Gly Ala Thr Lys Ser Trp Ser  
 325 330 335  
 Gly Gln Tyr Thr Ile Asp Cys Ala Ala Arg Asp Ser Thr Pro Asp Leu  
 340 345 350  
 Thr Phe Thr Leu Ala Gly Tyr Asn Phe Thr Ile Gly Pro Tyr Asp Tyr  
 355 360 365  
 Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser Ser Phe Thr Pro Met Asp  
 370 375 380  
 Ile Pro Ala Pro Ile Gly Pro Met Ala Thr Val Gly Asp Ala Phe Leu  
 385 390 395 400  
 Arg Lys Phe Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly Lys Asp Ala Val Gly Leu  
 405 410 415  
 Ala Pro Ala Ile  
 420

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1263

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 3

31

32

```

atgaagttca caatcccttt ttctgtcgct ttcagtatct tagctgctac taccttagtt    60
gatgccaaag ttactcaat tccaattaaa aaacactctt tagaagaac ttttaaagat    120
atttcttata atgattatit agcttcttta aagaataaat atatctcatt atataacaag    180
catcactcaa ataacgccgg tgaatctatt gaaggatgac aacaacaccc ttttatccca    240
ttcgttgaag ttgtcgatgg tgaattcaaa gattcaaaaa ctgatgctcc tttactaac    300
tatatgaatg ctcaatatit cacagaaatt caattaggtc cccaggtcag agtctttaaa    360
gttatcttag ataccggttc ttccaattta tgggtcccag gtaaggattg ttcttcttta    420
gcttggtact tacactcaaa gtatgatcac gatgaatcgt caacttataa gaaaaacggt    480
accgaatttg ctattagata tgggtactggg tctttagaag gtttgtctc ttctgatact    540
ttaaccattg gagatttggg tatcccagat caaggttttg ctgaagccac ttctgaacca    600
ggtttaactt ttgcctttgg taaattcgat ggtatcttag gtttagctta tgacactatc    660
tctgtccaga aagttgttcc tccagtctat aaagccattg attcaggttt attagacaaa    720
ccacaatttt ctttctactt aggtgatacc gctaaatcag aaactgatgg tgggtgtgcc    780
acttttgggt gtatcgatga atctaaattc aacggtaagc ttacctggtt gcctgttaga    840
agaaaggctt actgggaagt tgcattcgat ggtgtcggat taggttctga atatgctcct    900
ttactaaata caggtgccgc cattgataca ggtacctctt taatcgcttt accatcaggt    960
ttagctgaaa tcttaaaact tgaaattggg gccactaaat cttggtctgg tcagtacact   1020
atcgattgtg ccgctagaga ttctctacca gatttaacct tcactttagc tggttacaat   1080
ttcaccattg gtccttacga ttatacttta gaagtttctg gttcttgtat ctcttctttc   1140
actccaatgg atatcccagc tccaattggg ccaatggcta ccgttggtga tgccttctta   1200
agaaaattct actctgttta cgatttaggt aaagatgctg ttggtttagc tccagctatc   1260
taa

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 4

```

Met Lys Phe Thr Ile Pro Phe Ser Val Ala Phe Ser Ile Leu Ala Ala
  1             5             10             15
Thr Thr Leu Val Asp Ala
                20

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 5

```

Ile Asp Thr Gly Val Ser Val Thr His Glu Glu Phe Asp Gly Arg Ala
  1             5             10             15
Lys Trp Gly Lys Thr Ile Pro Thr Asp Asp Ser Asp Val Asp Gly Asn
                20             25             30
Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile Gly Ser Lys Asp Tyr Gly
                35             40             45
Ile Ser Lys Asn Ala Glu Ile Val Ala Val Lys Val Leu Lys Thr Asn
                50             55             60
Gly Ser Gly Thr Met Ser Asp Val Val Lys Gly Val Glu Phe Ala Ala
                65             70             75             80
Asn Ala His Ile Lys Ala Leu Lys Glu Ser Lys Pro Gly Phe Lys Gly
                85             90             95

```

33  
 Ser Thr Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly Lys Ser Pro Ala Leu Asp  
 100 105 110  
 Leu Ala Val Asn Ala Ala Val Lys Ala Gly Leu His Phe Ala Val Ala  
 115 120 125  
 Ala Gly Asn Asp Asn Ala Asp Ala Cys Asn Tyr Ser Pro Ala Ala Ala  
 130 135 140  
 Glu Lys Ala Val Thr Val Gly Ala Ser Thr Leu Ser Asp Ser Arg Ala  
 145 150 155 160  
 Tyr Phe Ser Asn Phe Gly Lys Cys Val Asp Ile Phe Ala Pro Gly Leu  
 165 170 175  
 Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Ile Gly Ser Asp Ser Ala Thr Ala Val Leu  
 180 185 190  
 Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Cys Gly Leu Leu Thr Tyr  
 195 200 205  
 Phe Leu Ser Leu Gln Pro Glu Ser Glu Ser Leu Phe Ser Thr Ala Ala  
 210 215 220  
 Ile Thr Pro Asp Gln Leu Lys Lys Asn Ile Ile Asp  
 225 230 235

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 708

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Candida boidinii

&lt;400&gt; 6

atcgatactg gtgtttctgt tacccatgaa gaattcgatg gtagagctaa atggggtaaa 60  
 accatcccaa ctgatgactc tgaatgtgat ggtaacggtc acgggtactca ctgtgccggt 120  
 accattgggt cttaaagatta cggatatctca aagaatgctg aaatcgttgc cgttaaagtc 180  
 ttaaagacta atgggtcagg taccatgtct gatgtcgta aagggtgtga atttgcgtct 240  
 aacgctcata tcaaggcatt aaaggaatct aaaccgggtt tcaaaggttc tactgccaat 300  
 atgtccttag gtggtggtaa atcaccagct ttagacttag ctgttaatgc tgcgtttaa 360  
 gctggtttac atttcgccgt tgcgtcaggt aatgataacg ctgatgcttg taactattct 420  
 ccagctgctg ctgaaaaggc tgttaccgtt ggtgcttcaa ctttatctga ttctagagct 480  
 tacttttcca atttcggtaa atgtgttgat atttttgctc cagggtttaa tatcttatct 540  
 acttatattg gtctgattc tgctacagct gttttaagtg gtacttcaat ggccctccca 600  
 cactgttggt gtttattaac ttatttctta tctttacaac cagaatctga atccttattt 660  
 tcaactgctg ctattacccc agatcaatta aagaaaaata ttatcgat 708

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1806

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 7

gcacaggcgg gctcgtcgtc ctcttgctgc tcgtctatgg cgctggctcc gtgcgcgggg 60  
 acacgcctgc caactgcacc tacccgacc tgcgtggcac ctgggtcttc cagggtgggt 120  
 ccagcggctc ccagcgcgat gtcaactget cggatgatgg acccccagaa aaaaaagtgg 180  
 tgggtcacct caagaagttg gatacagcat atgatgactt tggcaattcc ggccatttca 240  
 ccatcattta caatcaaggc tttgagattg tgttgaatga ctacaagtgg ttcgcctttt 300  
 ttaagtataa agaagagggt ggcaaggtaa ccagttactg ccacgagacc atgactggct 360  
 ggggtccatga cgtgctgggc cggaactggg cctgtttcac tggaaggaag acaggaata 420  
 cctcgagaaa cgtgaacgtg aacacagcac gccttgcggg tctcgaggaa acgtattcta 480  
 ataggctcta cagatataac catgactttg tgaagctat caatgccatt cagaagtctt 540

35

36

```

ggactgcagc cccatacatg gaatatgaga ctcttaccct aaaagagatg attaggagag 600
gtggtggcca tagccggaga attccaaggc ccaaactgc accaatcact gctgaaatac 660
agaaaaagat ttgcatgtg ccaacatcct gggattggag aaacgttcat ggtatcaatt 720
ttgttactcc tgttcgaaac caagggtctt gtggaagctg ctactcattt gcttctatgg 780
ggatgatgga agcaagaate cgcatactaa ccaacaacac tcagaccccg atcttgagtc 840
ctcaggaggt tgtgtcttgc agtcagtatg ctcaaggctg tgaagggtgc ttccttacc 900
tcatcgcagg gaagtatgcc caggactttg ggttgggtga agaggactgt ttccttacc 960
caggcacgga ttcgccgtgc agactgaaag agggctgctt ccggtactat tctccgagt 1020
accactacgt gggcggtttc tacgggggct gcaatgaagc cctgatgaag cttgagctgg 1080
tccatcaggg gcccatggcc gtcgctttg aagtctacga cgacttcctc cactaccgca 1140
agggcgtcta ccaccacacg gggctgcgag accctttcaa ccccttcgag ctgaccaatc 1200
atgctgtgct gctggtgggc tatggcactg acgcggcctc tggactggat tactggattg 1260
ttaaaaacag ctggggcacc agctggggtg agaacggta cttccgcacg cgacaggaa 1320
ccgacgagtg tgcgatcgaa agcatagcgc tggcggccac cccgattcct aagttgtagg 1380
gtgtacctcg cagggtttca cgtgaccac cgccagccag gaagggaaga tgccttattc 1440
agggactgga gacatgtacg gtattgtac tgcagtttca aaagattata gatagcttcc 1500
tgtgaagatc tgtgccttta caattaaaag tgcccttgat ttttaattta atacactttc 1560
cccctgaaaa gcagtctgct ttttctcag tactctgttc agtgcggttt ttatggagga 1620
tggtgagaga cgaagtaatg gattttgcta atcattttgt gatccaaacg catgctgtat 1680
tttaaaaaca atcgacagaa ccacacaggc ttatttttaa attgtataaa tcatgagaca 1740
atgtgacaat ggttattaaa aaaattttat aaatattcaa gtgatalaaa aaaaaaaaaa 1800
aaaaaa 1806

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1377

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 8

```

acg agg cgg ctc gtc gct ctc ttg ctg ctc gtc tat ggc gct ggc tcc 48
Thr Arg Arg Leu Val Ala Leu Leu Leu Val Tyr Gly Ala Gly Ser
      1              5              10              15
gtg cgc ggg gac acg cct gcc aac tgc acc tac ccc gac ctg ctg ggc 96
Val Arg Gly Asp Thr Pro Ala Asn Cys Thr Tyr Pro Asp Leu Leu Gly
              20              25              30
acc tgg gtc ttc cag gtg ggc tcc agc ggc tcc cag cgc gat gtc aac 144
Thr Trp Val Phe Gln Val Gly Ser Ser Gly Ser Gln Arg Asp Val Asn
              35              40              45
tgc tcg gtg atg gga ccc cca gaa aaa aaa gtg gtg gtg cac ctc aag 192
Cys Ser Val Met Gly Pro Pro Glu Lys Lys Val Val Val His Leu Lys
              50              55              60
aag ttg gat aca gca tat gat gac ttt ggc aat tcc ggc cat ttc acc 240
Lys Leu Asp Thr Ala Tyr Asp Asp Phe Gly Asn Ser Gly His Phe Thr
              65              70              75              80
atc att tac aat caa ggc ttt gag att gtg ttg aat gac tac aag tgg 288
Ile Ile Tyr Asn Gln Gly Phe Glu Ile Val Leu Asn Asp Tyr Lys Trp
              85              90              95
ttc gcc ttt ttt aag tat aaa gaa gag ggt ggc aag gta acc agt tac 336
Phe Ala Phe Phe Lys Tyr Lys Glu Glu Gly Gly Lys Val Thr Ser Tyr
              100              105              110
tgc cac gag acc atg act ggc tgg gtc cat gac gtg ctg ggc cgg aac 384

```

37		38
Cys His Glu Thr Met Thr Gly Trp Val His Asp Val Leu Gly Arg Asn		
115	120	125
tgg gcc tgt ttc act gga agg aag aca gga aat acc tcg gag aac gtg	432	
Trp Ala Cys Phe Thr Gly Arg Lys Thr Gly Asn Thr Ser Glu Asn Val		
130	135	140
aac gtg aac aca gca cgc ctt gcg ggt ctc gag gaa acg tat tct aat	480	
Asn Val Asn Thr Ala Arg Leu Ala Gly Leu Glu Glu Thr Tyr Ser Asn		
145	150	155
agg ctc tac aga tat aac cat gac ttt gtg aaa gct atc aat gcc att	528	
Arg Leu Tyr Arg Tyr Asn His Asp Phe Val Lys Ala Ile Asn Ala Ile		
165	170	175
cag aag tct tgg act gca gcc cca tac atg gaa tat gag act ctt acc	576	
Gln Lys Ser Trp Thr Ala Ala Pro Tyr Met Glu Tyr Glu Thr Leu Thr		
180	185	190
cta aaa gag atg att agg aga ggt ggt ggc cat agc cgg aga att cca	624	
Leu Lys Glu Met Ile Arg Arg Gly Gly Gly His Ser Arg Arg Ile Pro		
195	200	205
agg ccc aaa cct gca cca atc act gct gaa ata cag aaa aag att ttg	672	
Arg Pro Lys Pro Ala Pro Ile Thr Ala Glu Ile Gln Lys Lys Ile Leu		
210	215	220
cat ttg cca aca tcc tgg gat tgg aga aac gtt cat ggt atc aat ttt	720	
His Leu Pro Thr Ser Trp Asp Trp Arg Asn Val His Gly Ile Asn Phe		
225	230	235
gtt act cct gtt cga aac caa ggg tct tgt gga agc tgc tac tca ttt	768	
Val Thr Pro Val Arg Asn Gln Gly Ser Cys Gly Ser Cys Tyr Ser Phe		
245	250	255
gct tct atg ggg atg atg gaa gca aga atc cgc ata cta acc aac aac	816	
Ala Ser Met Gly Met Met Glu Ala Arg Ile Arg Ile Leu Thr Asn Asn		
260	265	270
act cag acc ccg atc ttg agt cct cag gag gtt gtg tct tgc agt cag	864	
Thr Gln Thr Pro Ile Leu Ser Pro Gln Glu Val Val Ser Cys Ser Gln		
275	280	285
tat gct caa ggc tgt gaa ggt ggc ttc cct tac ctc atc gca ggg aag	912	
Tyr Ala Gln Gly Cys Glu Gly Gly Phe Pro Tyr Leu Ile Ala Gly Lys		
290	295	300
tat gcc cag gac ttt ggg ttg gtg gaa gag gac tgt ttc ccc tac aca	960	
Tyr Ala Gln Asp Phe Gly Leu Val Glu Glu Asp Cys Phe Pro Tyr Thr		
305	310	315
ggc acg gat tcg ccg tgc aga ctg aaa gag ggc tgc ttc cgg tac tat	1008	
Gly Thr Asp Ser Pro Cys Arg Leu Lys Glu Gly Cys Phe Arg Tyr Tyr		
325	330	335
tcc tcc gag tac cac tac gtg ggc ggt ttc tac ggg ggc tgc aat gaa	1056	
Ser Ser Glu Tyr His Tyr Val Gly Gly Phe Tyr Gly Gly Cys Asn Glu		
340	345	350
gcc ctg atg aag ctt gag ctg gtc cat cag ggg ccc atg gcc gtc gcc	1104	
Ala Leu Met Lys Leu Glu Leu Val His Gln Gly Pro Met Ala Val Ala		
355	360	365
ttt gaa gtc tac gac gac ttc ctc cac tac cgc aag ggc gtc tac cac	1152	
Phe Glu Val Tyr Asp Asp Phe Leu His Tyr Arg Lys Gly Val Tyr His		
370	375	380

39  
 cac acg ggg ctg cga gac cct ttc aac ccc ttc gag ctg acc aat cat 1200  
 His Thr Gly Leu Arg Asp Pro Phe Asn Pro Phe Glu Leu Thr Asn His  
 385 390 395 400  
 gct gtg ctg ctg gtg ggc tat ggc act gac gcg gcc tct gga ctg gat 1248  
 Ala Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Thr Asp Ala Ala Ser Gly Leu Asp  
 405 410 415  
 tac tgg att gtt aaa aac agc tgg ggc acc agc tgg ggt gag aac ggt 1296  
 Tyr Trp Ile Val Lys Asn Ser Trp Gly Thr Ser Trp Gly Glu Asn Gly  
 420 425 430  
 tac ttc cgc atc cgc aga gga acc gac gag tgt gcg atc gaa agc ata 1344  
 Tyr Phe Arg Ile Arg Arg Gly Thr Asp Glu Cys Ala Ile Glu Ser Ile  
 435 440 445  
 gcg ctg gcg gcc acc ccg att cct aag ttg tag 1377  
 Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ile Pro Lys Leu  
 450 455  
 <210> 9  
 <211> 1402  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <400> 9  
 gcggccgcat gaagttcaca attccttttt ctgtcgttt ctctatctta gctgctacta 60  
 ctttagttga tgctgatact ccagctaatt gtacataacc agatctatta ggtacttggg 120  
 tctttcaagt tggttcttct ggttcacaaa gagatgttaa ttgttctgtt atgggtcttc 180  
 cagagaagaa agttgtcgtt cacttaaaga aacttgatac tgcttatgat gattttggta 240  
 attctggtea ttccactatt atctataatc aagggttcga aattgtcttg aatgattata 300  
 aatggtttgc tttctttaaa tataaagaag aagggtgtaa agttacttct tattgtcatg 360  
 aaactatgac aggttgggtt catgatgtcc taggtagaaa ttgggcttgt ttacttggtg 420  
 gaaagactgg taatacttct gaaaatgtta acgttaatac tgctagatta gctggttttag 480  
 aagaacata ctctaataga ttatctggtt ataactatga ttctgtcaaa gctattaatg 540  
 ctattcaaaa atcttggact gctgtcctt atatggaata tgaacatta actcttaaag 600  
 aaatgattag aagaggtggt ggtcattctc gtagaatacc tagacctaaa cctgcacctg 660  
 ttactgctga aattcagaag aaaactctac acttacctac tagttgggat tggagaaatg 720  
 ttcatggtat taactttggt actcctgtta gaaatcaagg ttcatgtggt tcttgttact 780  
 catttgcttc tatgggtatg atggaagcta gaattagaat ttgactaat aatactcaaa 840  
 ctctatctt atctccacaa gaagttgtct cttgttctca atatgctcaa ggttgtgaag 900  
 gtggtttccc atacttaatt gctggtaaat atgctcagga ctttggctca gttgaagaag 960  
 atgttttccc atatactggt actgattctc catgtagatt gaaagaaggt tgtttcagat 1020  
 attactcttc tgaatatcat tatgttggtg gtttctatgg tggttgtaat gaagctttga 1080  
 tgaaattaga attagttcat caaggctcta tggtgttgc ttttgaagtc tatgatgatt 1140  
 tcttacatta tagaaaaggt gtttatcatc acactgggtt aagagatcca tttaatccat 1200  
 ttgagctcac taatcatgct gtcttattag ttggttatgg tactgatgct gcttctggtt 1260  
 tagattattg gattgttaag aactcatggg gtacttcttg gggtgaaaat ggttacttta 1320  
 gaattagaag aggtactgat gaatgtgcta ttgaatctat tgccttagct gctactccta 1380  
 ttctaaatt ataagcgccc gc 1402

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】この図はプロテイナーゼ A 遺伝子を含むプラスミド pCPRA1 の制限酵素地図を示す。

【図 2】この図はプロテイナーゼ A 遺伝子破壊プラスミド pDPRA1 の構築手順を示す。

【図 3】この図は *Candida boidinii*

SK612 株、SK740 株、SK741 株の PEP4 遺伝子座の制限酵素地図を示す。

【図 4】この図はプロテイナーゼ B 遺伝子及び、プラスミド pCPRB1、pCPRB2 の制限酵素地図を示す。

す。

【図5】 この図はプロテイナーゼB遺伝子破壊プラスミドpDPRB1の構造を示す。

【図6】 この図は、*Candida boidinii* SK741株、SK774株、SK775のPRB1遺伝子座の制限酵素地図を示す。

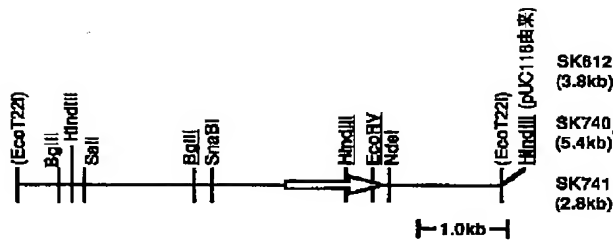
【図7】 この図は、プラスミドpCTC-S1の構築手\*

\* 順を示す。

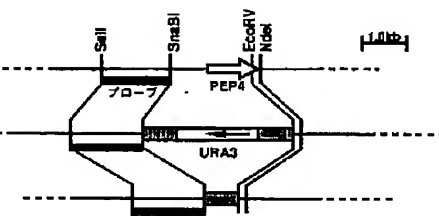
【図8】 この図は、プラスミドpECTC-S1の構築手順を示す。

【図9】 この図は、*Candida boidinii* SK612株及びSK741株を宿主としたカテプシンC発現株の培地上清のカテプシンC活性を示す。

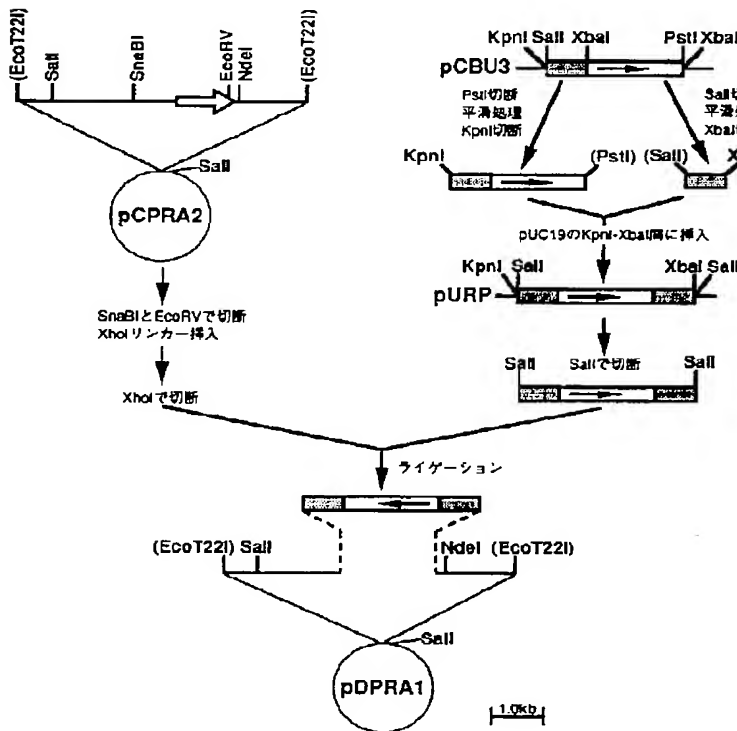
【図1】



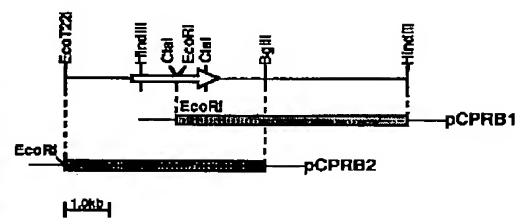
【図3】



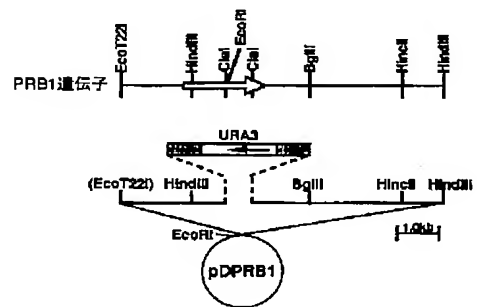
【図2】



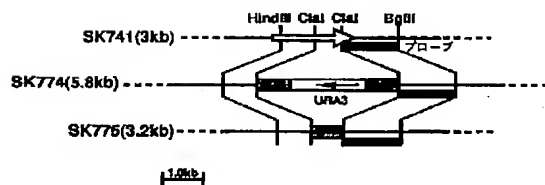
【図4】



【図5】

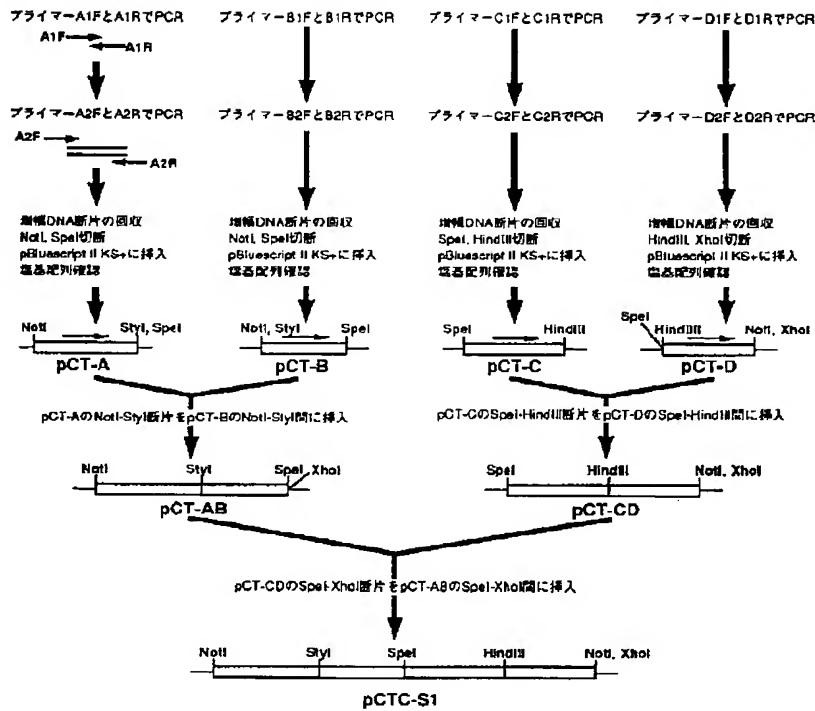


【図6】

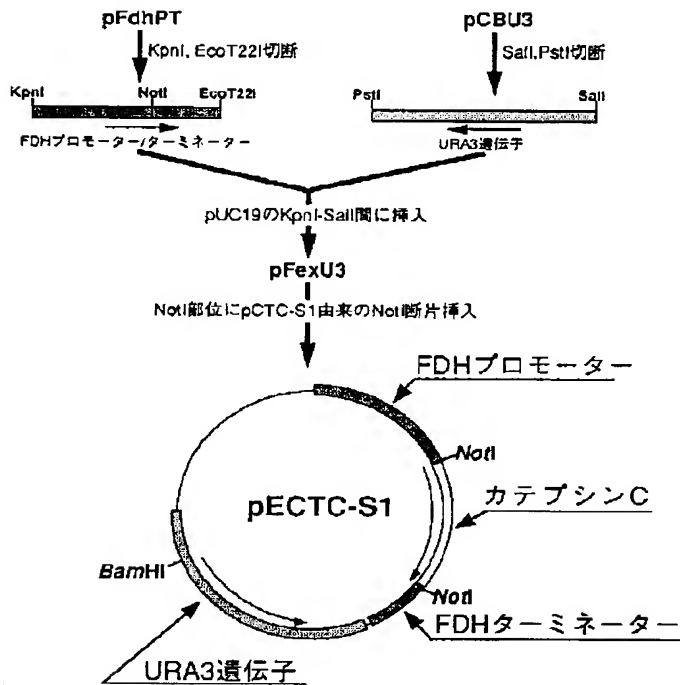




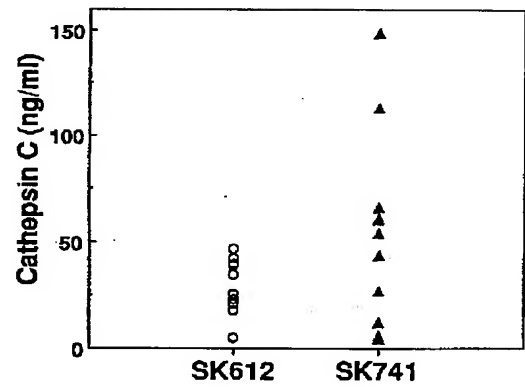
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/60		C 1 2 N 9/60	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
/(C 1 2 N 1/19			
C 1 2 R 1:72)			
(C 1 2 N 9/14			
C 1 2 R 1:72)			
(C 1 2 N 9/60			
C 1 2 R 1:72)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:72)			

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA20 BA14 CA03 DA12  
EA04 FA18 GA11 HA01  
4B050 CC03 DD11 EE10 LL05  
4B064 AG01 CA06 CA19 CC24 DA01  
DA16  
4B065 AA73X AB01 AC11 AC15  
AC20 CA33 CA44 CA60  
4H045 AA10 AA20 BA10 CA40 DA89  
FA74 GA15